

質量分析によるラット脳ドーパミンの高感度定量

Quantitative analysis of the rat brain dopamine using mass spectrometry.

成田 和巳*

1. はじめに

質量分析装置(MS)は質量荷電比を測定することにより分子量を求める装置です。近年、分析方法の多様化とデータ解析ソフトの向上により、活躍する場面が急速に広がりつつある。たとえばタンパク質などの大きな分子にも適応可能なイオン化法が開発され液体クロマトグラフ(LC)と連結してLC/MSとして使用することにより、生体試料を対象とした物質定量へと可能性が広がった。

医学、生物学の分野で物質定量を行う際の代表格として、RIA法、ELISA法がある。目的物質に対する特異的な抗体が必要だが、感度は非常に良く必要な機器類は汎用機器として出回っていて、新たに特殊な機器を必要としない利点がある。

質量分析器は機械的に物質の質量を測定するので、抗体のような目的物質に対応した特異的な物質は必要ないのでその適応範囲は広く分析可能な物質も多くなる。また測定した結果が、試料に含まれる様々な物質の質量と存在量を反映した質量スペクトルとして得られ、一度の分析で多種の物質を同時に測定する網羅的分析が可能になる。RIAやELISAと比べても測定感度は肩を並べるほどに向上してきているが、機器が高価格なためそれらほど普及していないというのが現状だ。それでも低価格を実現させた高性能な機器が商品化されてきているので、近い将来には医学、生物学における物質定量法の主要な選択肢の一つとなるだろう。

質量分析器の性能を生かして高感度分析を行おうとすると様々な問題点に直面する。とりわけ大きな問題となるのが、質量分析では試料中の様々な物質が質量スペクトルとして出力されるので、結果はピーク数が非常に多くかなり複雑なスペクトルとなることだ。とくに微量分析を試みる場合、目的物質由来のピークを識別するのが困難になる。このたび科学技術振興機構(JST)育成研究^(*)にてその問題を解決できるような質量分析用の新規標識試薬を開発し、そしてドーパミンの高感度分析に成功したのでこの場をお借りして紹介する。

2. 日立ハイテック 液体クロマトグラフ質量分析計

ここで用いたLC/MSは日立ハイテクノロジー製

NanoFrontier eLD (nano-LC/MS) で、LC部はnl/minという非常に微量の流速をコントロールすることができる。そしてカラムにはモノリス製の内径50 μmという従来のマイクロLCに使用されるカラムと比べ1/100の極細カラムを使用している。質量分析部にはエレクトロスプレーイオン化(ESI)法を採用しているので、nano-LCの極小流速による濃縮効果により、質量分析の感度を格段に上げることができる。



成田 和巳

3. 質量分析用の新規標識試薬

標識試薬としてアミン反応性をもつピリリウムを基本骨格とした新規物質(PyII)^(*)を開発した。ピリリウムはアミノ基と反応し共有結合を形成する。生体内の物質にはタンパク質やペプチド、カテコールアミンなどのアミン類といったアミノ基を有するものが多いので、ピリリウムはそれらの標識試薬として有望だ。そこでピリリウムのアミノ基に対する反応性を保ちつつ炭化水素の側鎖を付加することにより、分子内の炭素原子数を13個に増やした新規物質PyIIを開発した。そしてPyIIに安定同位体¹³Cを組み込み同位体標識試薬を作製した。

ここで質量分析器と同位体標識試薬を組み合わせる使用することの有用性について、ピリリウムを例に簡単に説明する。図1にピリリウム環の構造を示す。ピリリウム分子には炭素原子が5個含まれている。炭素原子は¹²Cだが、天然には安定同位体として¹³Cが約1%存在する。そして物質を合成する際に原料として¹³Cを用い、任意の個数の¹³Cを目的物に組み込むことができる。例

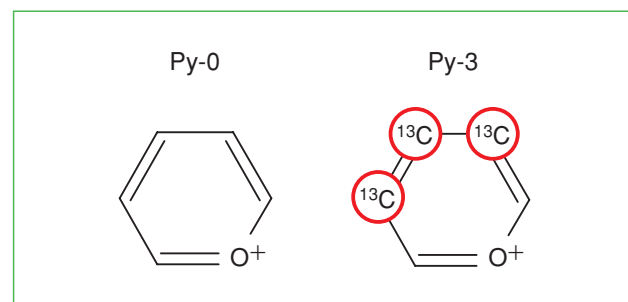


図1 ピリリウムの基本構造(左)と安定同位体の挿入例(右)

* 福井大学 医学部 医学科 助教 獣医学博士

として安定同位体 ^{13}C を3個組み込んだものを右側に示す。これら二つの物質には分子量差3が生じる。左側の ^{13}C の組み込まれた個数が0個のピリウム(Py)をPy-0、右側の ^{13}C が3個組み込まれたものをPy-3と表記することにする。図2ではこれを用いたあるサンプル(図中の星形の物質)をPy-0で、別のサンプルをPy-3と反応させ、標識後に混合して同時にLC/MS分析する。Py-0で標識された化合物もPy-3で標識された化合物も化学特性は等しいので、LCによるカラム溶出時間は等しくなる。つまりUVや蛍光、吸光度などの検出方法ではこの二つの化合物を区別することはできない。しかしMS分析を行えば二つの物質には質量差3があるので、二つの異なるピークとして識別することができる。

新規同位体標識試薬の作製ではPyIIに組み込む ^{13}C の個数のバリエーションとして0, 2, 4, 6, 8, 10, 12個、すなわちPyII-0, 2, 4, 6, 8, 10, 12の質量差2の7種類を作製した。これにより1回のMS測定で最大7個のサンプルを同時に測定することが可能となる。

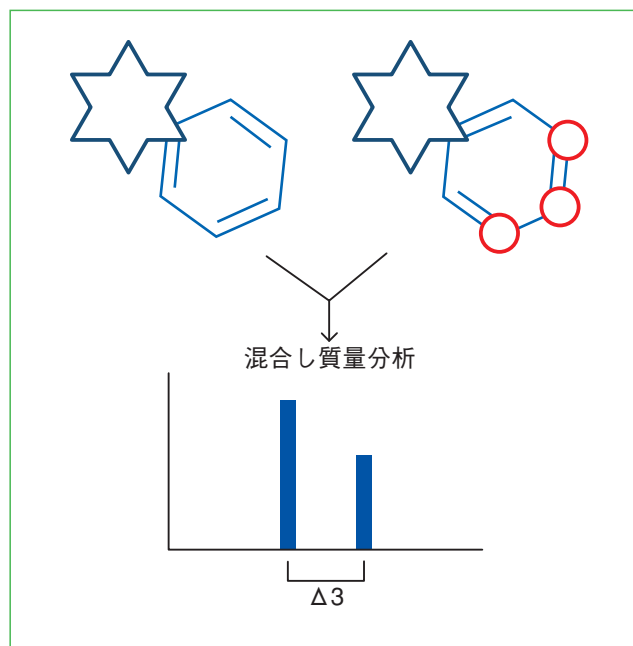


図2 質量分析による同位体標識化合物の識別。☆で示した物質をピリウムで標識し質量分析を行い質量差により識別する。

4. PyII標識による物質測定^{*3}

種々のアミノ酸、アミン、カテコールアミンについてPyIIによる標識とnano-LC/MSによる検出が可能か検討した。2 nmol (1 mM, 2 μl) のL-アラニン、L-グルタミン酸、グリシン、GABA、オルニチン、セロトニン、ドーパミン、ノルアドレナリン、L-Dopaもしくは20 nmol (10 mM, 2 μl) のヒスタミンをPyII試薬で標識した。PyII試薬はPyII-0, 2, 4, 6, 8, 10, 12それぞれを等量混合した計100 mMの溶液を準備し、標識反応には1 μl (100 nmol) 使用した。標識反応後0.05 M HClで希釈し、1 pmol (ヒスタミンは10 pmol) 相

当をnano-LC/MSにて測定した。

測定条件はLC部では分離カラムにはモノリスODSのMonoCap for FastFlow (ジーエルサイエンス)、トラップカラムにはODSのMonolith Trap (ジーエルサイエンス)を使用した。移動相にはA) 酢酸/水/アセトニトリル=0.1/98/2 (%)とB) 酢酸/水/アセトニトリル=0.1/2/98 (%)を、A / B=98/2 (0 min) - 2/98 (50 min) のグラジエント条件で200 nl/minの流速で送液した。MS部ではイオン化法はエレクトロスプレーイオン化の正イオンモードを、MS測定の際のスキャン範囲はm/z 100-500とした。

今回検討した10種類の物質L-アラニン、L-グルタミン酸、グリシン、GABA、ヒスタミン、オルニチン、セロトニン、ドーパミン、ノルアドレナリン、L-Dopaのうちグルタミン酸(1 pmol相当)、ノルアドレナリン(1 pmol相当)、ヒスタミン(10 pmol相当)の分析結果を図3、4、5に示す。上図にはm/z 322.2 (グルタミン酸)、344.2 (ノルアドレナリン)、286.2 (ヒスタミン)で抽出したクロマトを、下図にはクロマト中の▼で示したピークでの質量スペクトルを示す。グルタミン酸、ノルアドレナリン、ヒスタミンとPyII-0が反応してできる標識化合物の分子量理論値はそれぞれ322.2, 344.2, 286.2になる。そしてそれぞれの質量スペクトルには理論値と一致したm/zから始まる分子量差2の7本の質量ピークが観察された。グラフには示していないが同様に測定した他の7種の物質でいずれも理論値と一致した質量ピークが検出された。なおヒスタミンの標識化合物は今回のクロマト条件では分離が悪く、ブロードなピークになった。

5. ラット脳ドーパミンの微量測定

5.1 標準曲線の作製

標準ドーパミン1,250 fmol, 625 fmol, 313 fmol, 156 fmol, 0 fmol, そして内部標準として500 fmolの3, 4-dihydroxybenzylamine (DHBA)を用いた。DHBA 500 fmolを含む標準ドーパミン溶液に5%過塩素酸を加え総量を10 μl とした。2 Mリン酸カリウム緩衝液、pH 12を20 μl 加えpH 9に保った。過塩素酸カリウムの沈殿を除去した後に、PyII試薬7種のうちいずれか100 mMを1 μl 加え、50 $^{\circ}\text{C}$ で15分間保温しPyII標識反応を行った。

次に、官能基にフェニルホウ酸(PBA)を持つカラム(MonoSpin PBA, GLサイエンス)により試料中のドーパミン-PyII化合物の精製を行った。試料をPBAに結合させ100 mMリン酸カリウム緩衝液pH 8.0で洗浄してから、0.5%トリフルオロ酢酸含有30%アセトニトリル溶液で溶出した。溶出液を減圧遠心濃縮機により濃縮し、孔径0.22 μm のフィルター(DURAPORE PVDF 0.22 μm , MILLIPORE)で濾過し、nano-LC/MSシステムにより分析した。nano-LC/MSは上記と同様の分析条件を用いた。得られた結果をDHBAにより標準

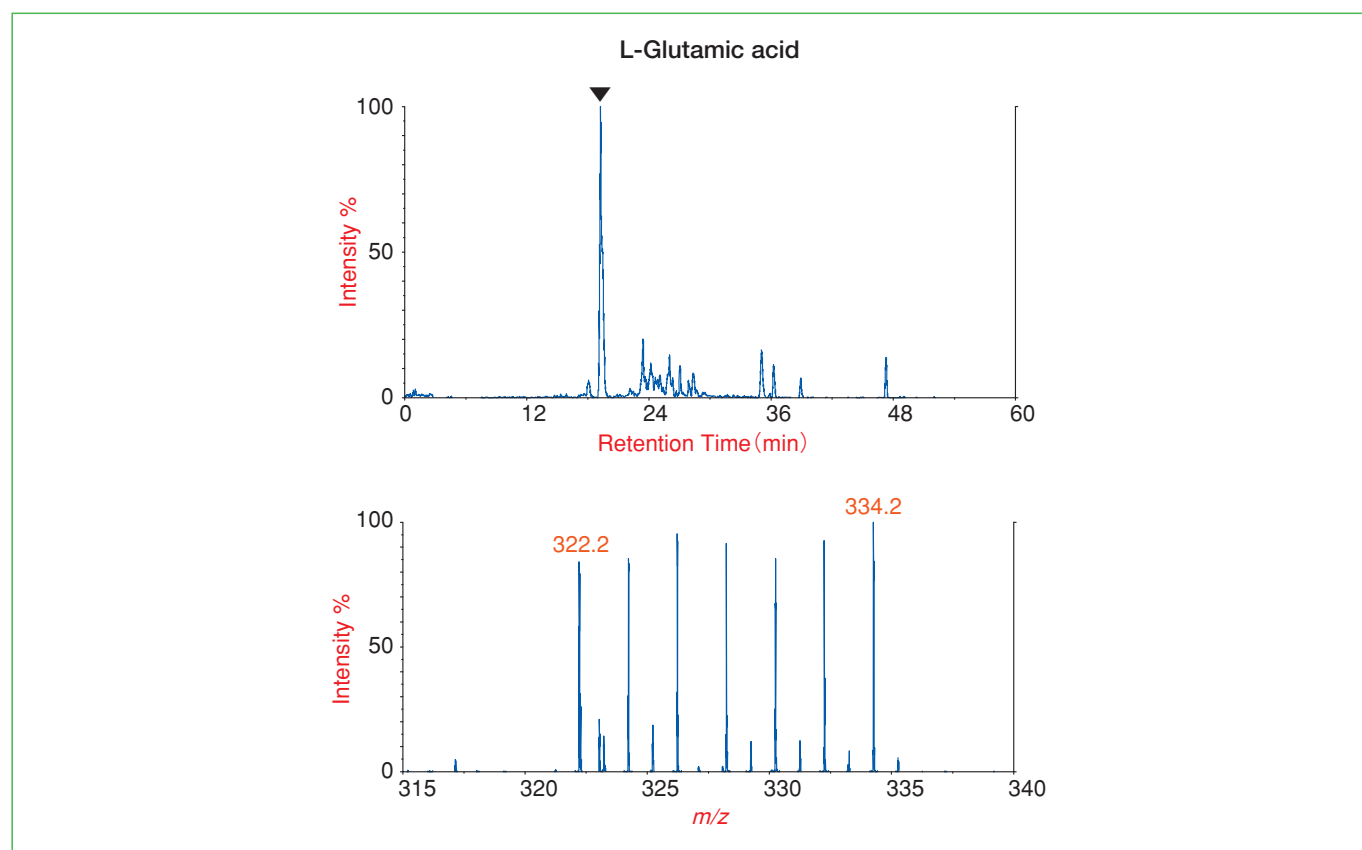


図3 nano-LC/MSで測定したPyIIで標識したグルタミン酸のスペクトル。(上) m/z 322.2で抽出したクロマト図。(下) クロマト中の▼で示したピークでの質量スペクトル図。縦軸はイオン強度を、横軸は上図ではLCの溶出時間を、下図ではm/zを示す。下図では質量の異なる7種の標識体ピークのうち、最小のものと最大のもののm/zを図中に示す。

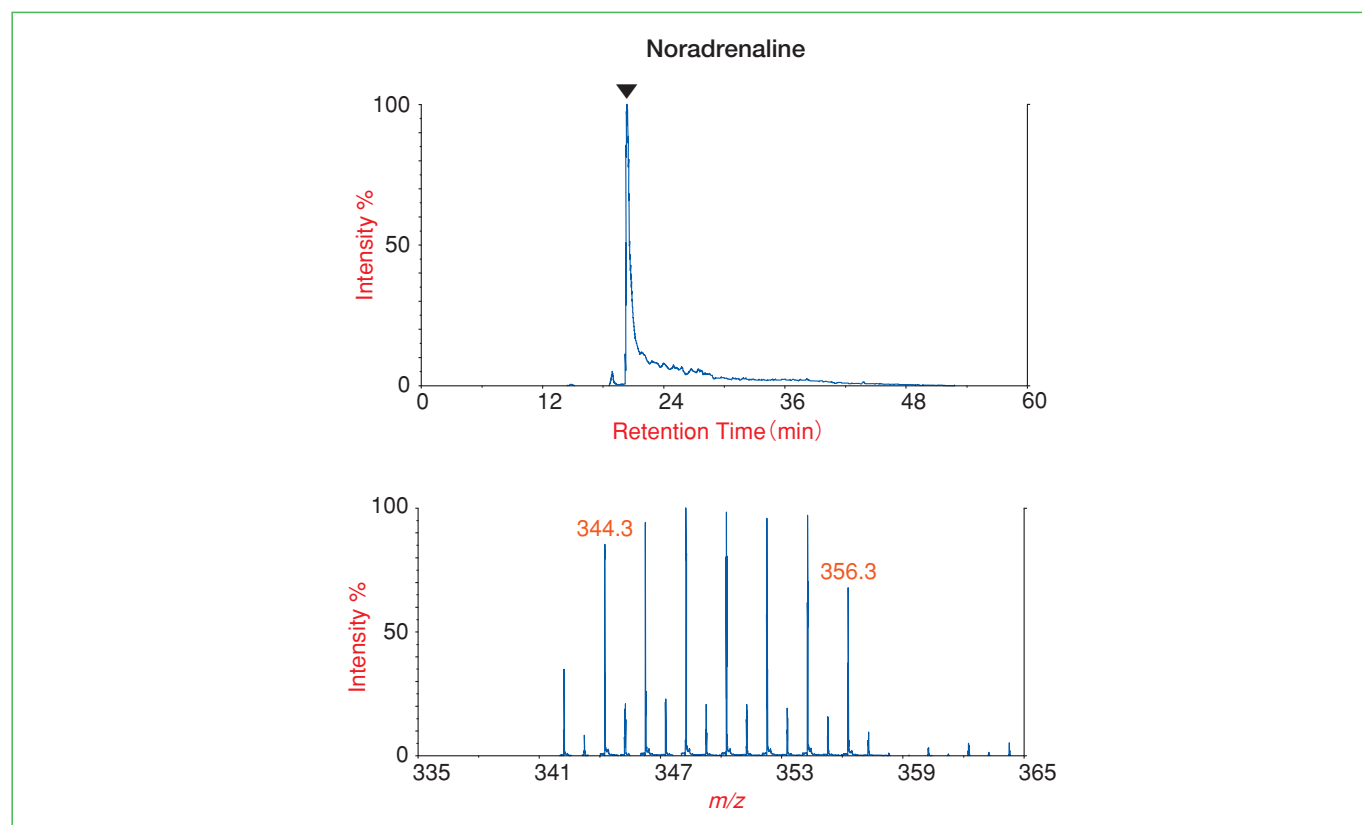


図4 nano-LC/MSで測定したPyIIで標識したノルアドレナリンのスペクトル。(上) m/z 344.2で抽出したクロマト図。(下) クロマト中の▼で示したピークでの質量スペクトル図。

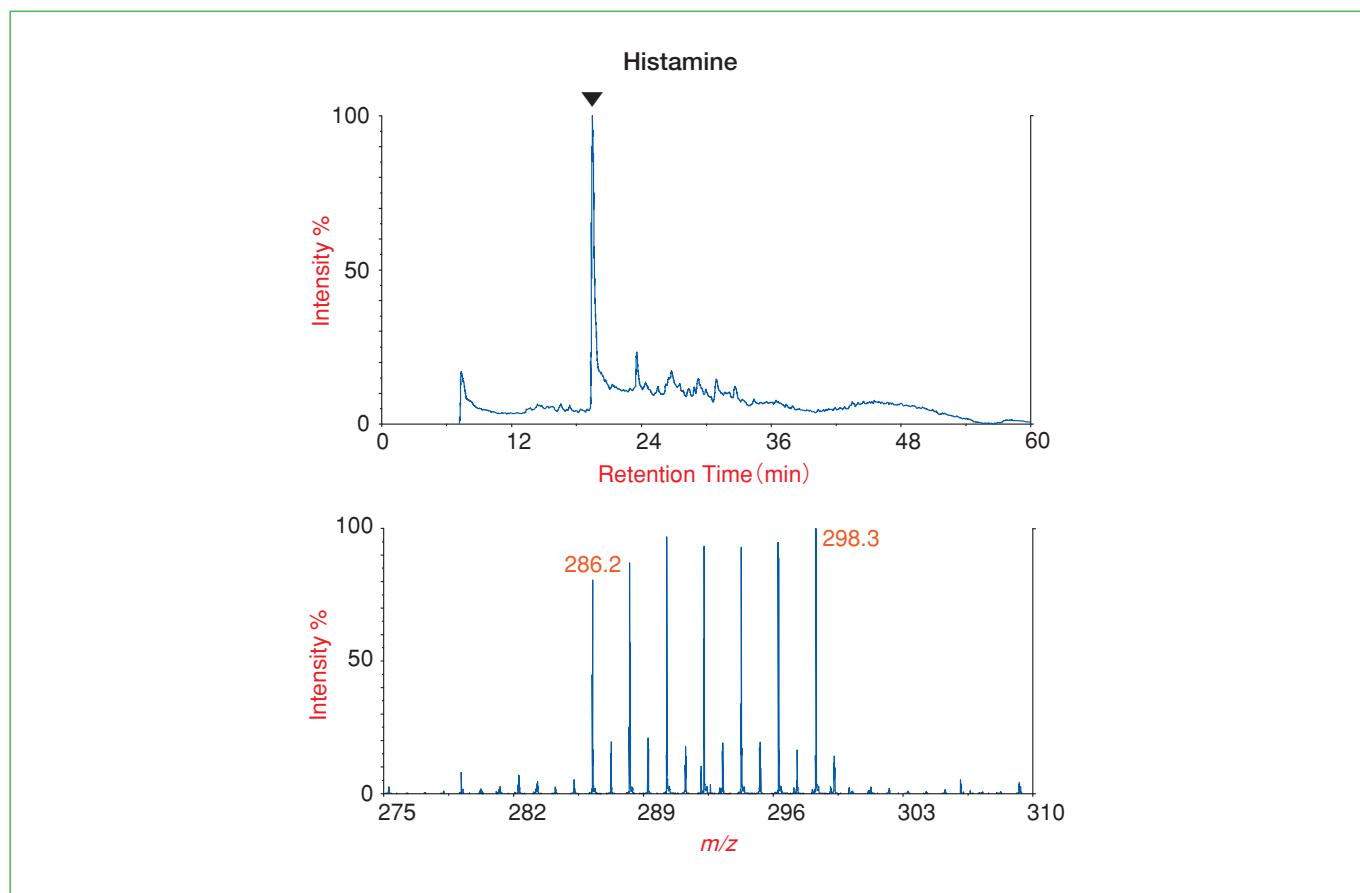


図5 nano-LC/MSで測定したPyIIで標識したヒスタミンのスペクトル。(上) m/z 286.2で抽出したクロマト図。(下)クロマト中の▼で示したピークでの質量スペクトル図。

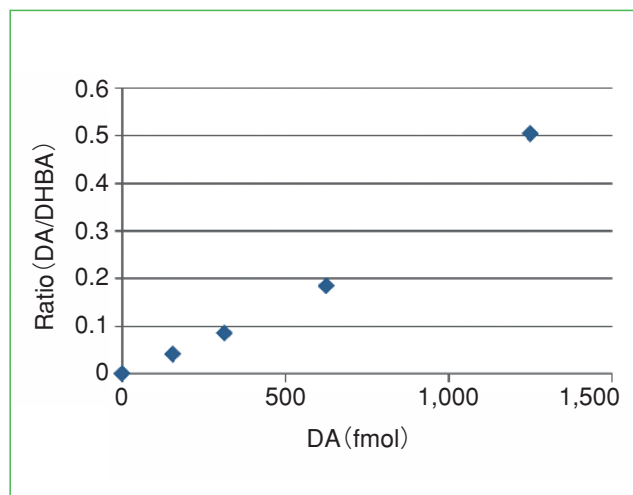


図6 ドーパミン標準曲線。縦軸は各サンプルに等量ずつ加えたDHBAにより標準化した値を示す。

化し作図すると直線関係が得られたことから(図6), DHBAを内部標準としてPyII標識によりドーパミンが定量できることが判明した。

5.2 ラット脳微小切片の作製

ラット頭部にマイクロウェーブの照射を行い(マイクロウェーブアプリアケーター, 室町機械)固定を行った。凍結マイクロトームにより線条体を含む部位の30 μm 厚の

脳組織切片を作成し, レーザーマイクロダイセクション(ASLMD, ライカ)により, 一辺1 mm四方, 厚さ30 μm の脳組織を得た。採取された各切片の体積は30 nlに相当する(図7)。続いて5%過塩素酸10 μl と内部標準物質としてDHBAを各試料あたり500 fmol (500 nM DHBA含有0.05 M塩酸溶液を1 μl)添加し, 除タンパクを行った。その後, 上述の方法に従いPyII標識反応を行い, PBAによる精製と減圧濃縮, フィルター濾過した後に, nano-LC/MSによる分析を行った。またPyIIによる標識反応ではinter-assay標準として625 fmolのドーパミンを用いた。

図8にPyIIで標識されたドーパミンの質量スペクトルの実際例を示す。ドーパミンとPyII-0が反応して出来る標識化合物の分子量理論値は328.2になる。そして質量スペクトルには m/z 328.2から始まる分子量差2の7本の質量ピーク(図中の赤丸)が観察された。図中で m/z 328.2のピークはinter-assay標準として用いた625 fmolドーパミン由来のピークを, m/z 330.2, 332.2, 334.2, 336.2, 338.2, 340.2のピークは30 nlのラット脳組織中ドーパミンを反映したピークを示す。得られた質量分析スペクトルの結果と図6の標準曲線に基づいて, 脳各部位のドーパミンの量を算出したものを図9に示した。図中の着色した四角は図7の組織写真に対応した30 nl相当の脳組織切片の部位を示す。ドーパミン含量は

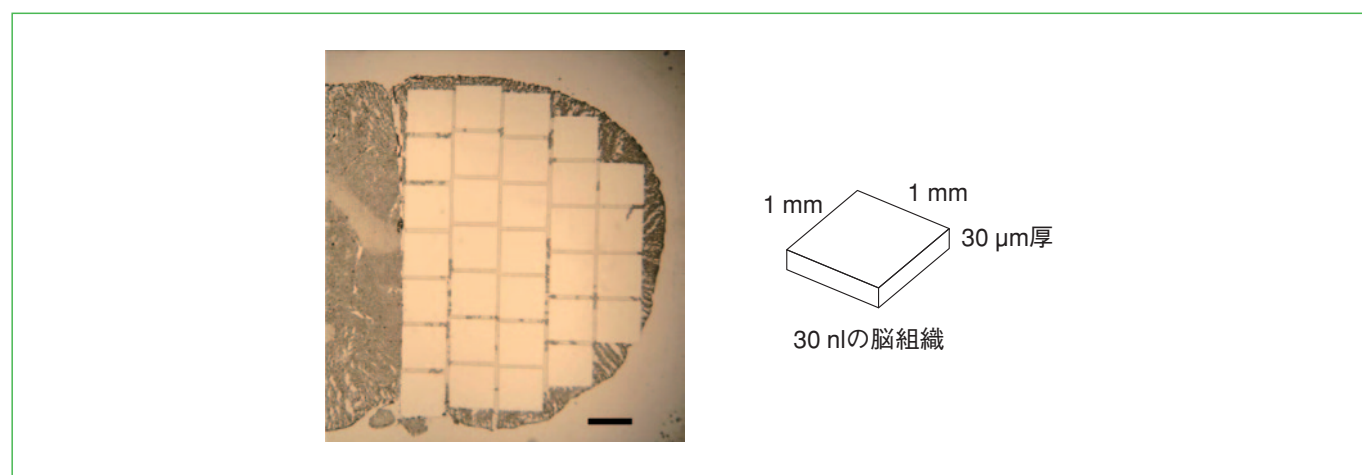


図7 レーザーマイクロダイセクションにより切り出された後のラット脳切片。黒線は1 mmを示す。右は切り出した微小切片の大きさを模式的に示す。

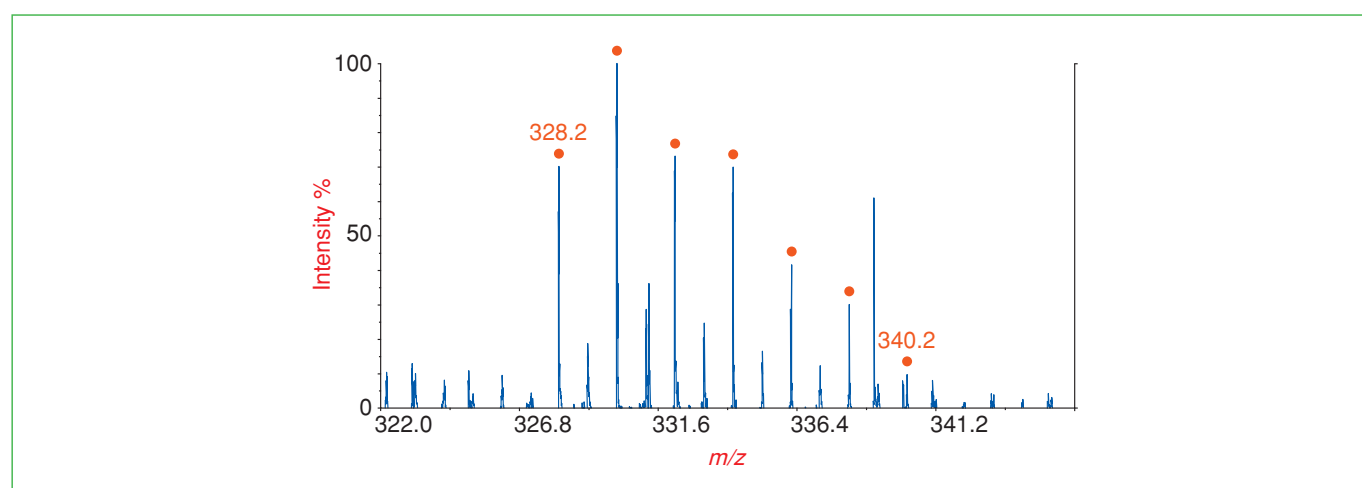


図8 PyIIで標識したドーパミンの質量スペクトル図。赤丸で示したピークが7種類の異なる質量のPyII試薬により標識されたドーパミンのピークを示す。

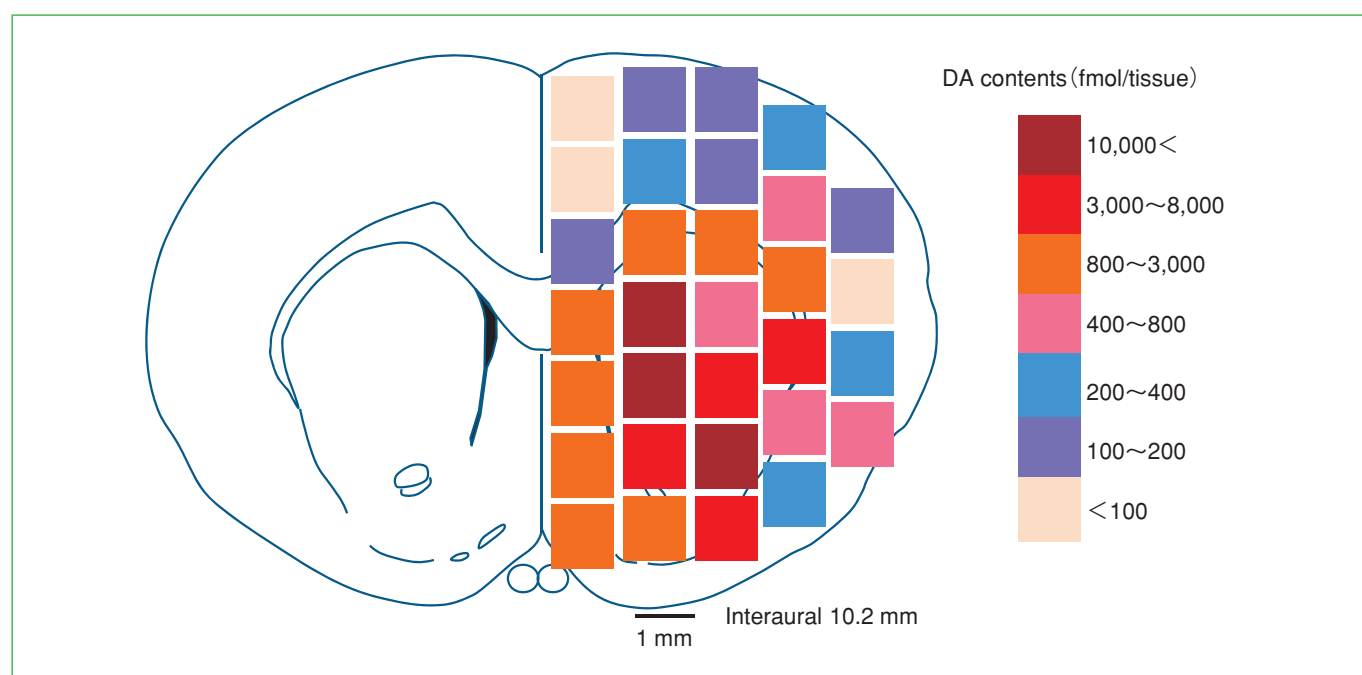


図9 線条体レベルでのラット脳前額断面図。着色した□は微小切片当たりのドーパミン含量を示す。

大脳皮質で少なく、線条体で多いという結果が得られた。

従来、ラット脳のドーパミン含量を測定する方法としては、マイクロウェーブ固定した脳から肉眼でナイフ等を用い目的部位のブロックを切り出し、酸抽出後にHPLC-電気化学検出器で検出する方法がしばしば用いられる。その方法で測定したラット線条体ドーパミン含量は約50 nmol/gの値を示す。この数値を図9で示した30 nl組織当たりに換算すると1,500 fmol/30 nlとなる。本実験の結果では線条体内部でドーパミン含量に大きな部位差が観察されたが、全体的には従来の方法に近い結果が得られている。

脳内では神経伝達物質としてアミノ酸やカテコールアミン、アミン類が重要な役割を果たしている。またある種のアミノ酸は神経活動を修飾する作用を持っている。

このような物質は脳内の部位によって濃度差が非常に大きくなっていて、脳内の局所におけるそれらの増減は神経活動の変化を表し、場合によっては何らかの疾病に直結する。従来の測定方法の感度ではラット、マウス脳の微量脳組織中の物質量を定量することは困難であった。ここで報告した方法を用いれば中枢神経疾患モデル動物の脳内の物質動態が詳細に検討できるようになり、病態解明に大きく役立つことが期待できる。

- *1 JST育成研究「プロテオーム解析用2種、およびメタボローム解析用1種の新規マルチ同位体標識化合物の開発と製品化」研究代表者 福井大学 松川茂
- *2 特許出願中。同位体標識ピリリウム化合物。出願番号 2012-079110
- *3 ここで測定した10種の物質の結果は日立ハイテクノロジーの好意により提供を受けている。